

Imunologie cvičení 8

Metody stanovení komplementu

MVDr. Mgr. Monika Dušková, Ph.D.

Komplement

30 komponent volných nebo membránově vázaných

9 hlavních složek C1 – C9

Funkce:

membranolytická C5b – C9(n)

opsonizační C3b

chemotaktická – anafylatoxiny C3a, C5a, C4a

Aktivace kaskádovitým způsobem

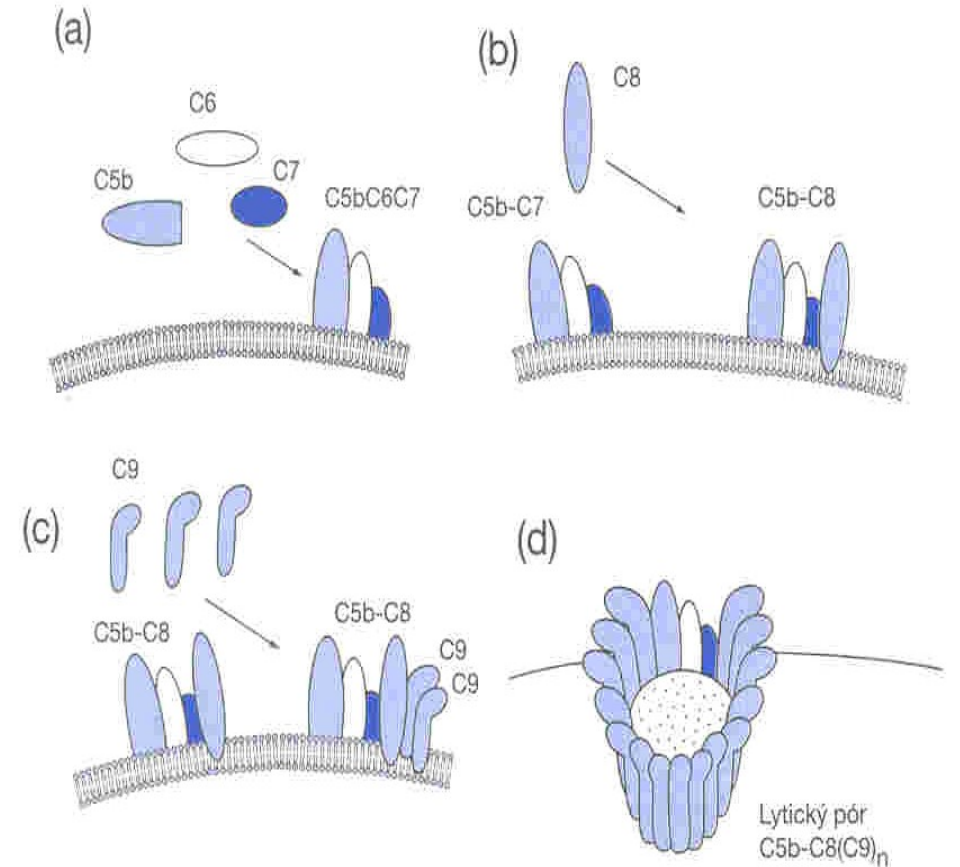
Z hlavních složek se odštěpují krátké úseky

Tři cesty aktivace:

Klasická (nutné protilátky)

Alternativní (reakce na umělé povrchy, bakteriální buňky)

Lektinová (interakce proteiny – sacharidy) jinak podobná klasické



Metody stanovování komplementu

Stanovení koncentrace jednotlivých složek v séru/plasmě

- problematické, krátký poločas rozpadu, nízké koncentrace
- komerční kity pro C3 a C4 složku
- turbidimetricky, nefelometricky, radiální difúzí, (případně ELISA)

Stanovení membranolytické aktivity – funkční testy

- měření hemolytické aktivity (lýza erytrocytů účinkem komplementu ve vzorku)
- hemolýzu lze sledovat v gelu pomocí radiální difúze nebo spektrofotometricky
- komerční CH 50 nebo CH 100 testy.



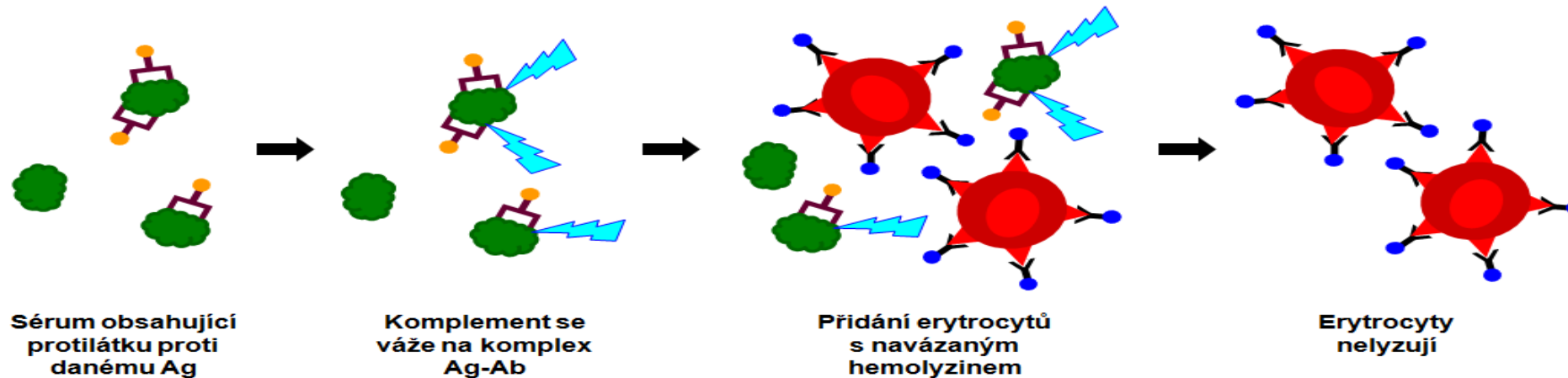
Komplement fixační reakce (KFR)

Reakce probíhá ve dvou krocích

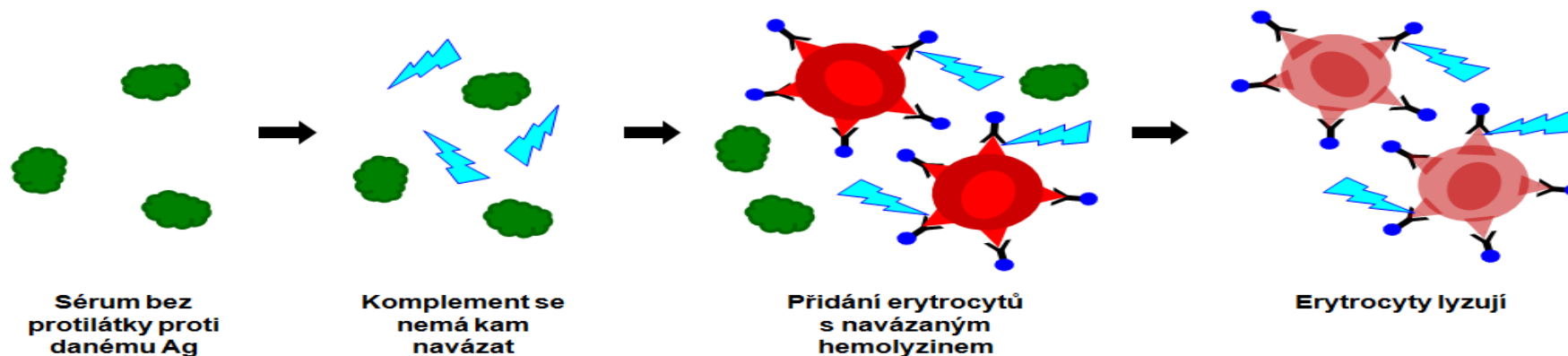
1. Komplement se naváže na komplex antigen – protilátka
(KFR lze použít pro zjišťování přítomnosti jedné z těchto složek ve vzorcích)
2. Hemolytický systém: beraní erythrocyty a králičí protilátka proti beraním erythrocytům
(tzv. *amboceptor neboli hemolyzin*)
Tento systém reaguje s komplementem a nastane hemolýza

Pokud v prvním kroku nevznikne IMK, komplement se nespotřebuje a zůstane pro 2. krok reakce – hemolýza ANO

Pokud v prvním kroku Ag a Ab odpovídají svou specifitou, IMK vznikne a komplement se spotřebuje – hemolýza NE



Pozitivní KFR: Sérum obsahuje protilátky proti danému antigenu a komplement je tudíž vyváznán na komplex Ag-Ab. Po přidání hemolytického komplexu (beraní erythrocyty s navázaným hemolyzinem) **nedochází k hemolýze**



Negativní KFR: Sérum neobsahuje protilátky proti danému antigenu a nevzniká komplex Ag-Ab, na který by mohl být váznán komplement. Po přidání hemolytického komplexu působením komplementu **nastane hemolýza**.

Diagnostické aspekty stanovení komplementu

Kdy se stanovují parametry komplementové kaskády:

- podezření na deficity jednotlivých složek, kdy je snaha tyto složky přímo stanovit (C3 a C4 složky)
- imunokomplexové choroby, kdy se rovněž stanovuje C3 a C4 složka. Koncentrace uvedených složek se u těchto chorob poměrně rychle mění. Normální hodnoty C3 a C4 složky se pohybují okolo 0,2 – 1,2 resp. 0,15 – 0,4 g/l.
- celková hemolytická aktivita se vyšetřuje při opakovaných vleklých infekcích některými patogeny a dále při podezřeních na imunodeficity
- Z diagnostického hlediska má význam stanovení některých regulačních složek komplementové kaskády. Zejména jde o tzv. **C1 inhibitor**, který za fyziologických okolností reguluje rozběhnutí celé kaskády hned na jejím počátku. Existuje deficit této složky, který se projevuje onemocněním zvaným **hereditární angioedém**.

Bioluminiscenční stanovení bakteriolytické aktivity komplementu

Princip:

- bioluminiscenční bakterie produkují světlo, to je detekováno na luminometru
- po přidání komplementu (vzorek séra/plasmy) jsou bakterie lyzovány přítomným komplementem
- lyzované bakterie už světlo neprodukují, tedy bioluminiscence se snižuje

Míra bioluminiscence je přímo úměrná viabilitě bakterií

Čím víc je ve vzorku komplementu, tím víc bakterií je lyzováno a tím menší je bioluminiscence